Über die chemische Natur der Katalase.

:: INAUGURAL-DISSERTATION ::
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Philosophischen Fakultät der
Universität Leipzig

vorgelegt von

Walter Gierisch
aus Kamenz in Sachsen.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Halle (Saale)
Buchdruckerei Heinrich John
1916.

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren

Paal und **Hantzsch.**

Leipzig, den 16. Mai 1916.

Der Prokanzellar.

G. Herglotz.

Eine Parallel-Publikation ist in der Zeitschrift für Fermentforschung, Band I, Heft 2, S. 165 ff. erschienen.

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit.

Vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1913 bis zum Juli 1914 im Laboratorium für angewandte Chemie der Universität Leipzig ausgeführt. Durch meinen Eintritt in das Heer verzögerte sich die Vollendung der Niederschrift bis zu meiner Rückkehr aus dem Felde.

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Geheimrat Professor Dr. C. Paal

erlaube ich mir an dieser Stelle für das mir jederzeit entgegengebrachte Wohlwollen meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Zu besonderem Danke bin ich ferner

Herrn Privatdozent Dr. P. Waentig

verpflichtet, von dem ich die Anregung zu vorliegender Arbeit empfing, und der mir stets in liebenswürdigster Weise mit seinem Rate zur Seite stand.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Einleitung 9
II. Löslichkeitsverhältnisse 11
III. Fraktionierte Fällung 18
IV. Dialyse 26
V. Aschenanalysen 36
VI. Ist die Katalase ein Eiweißkörper? 42
VII. Adsorptionsversuche 47
VIII. Ist die Katalase ein Nukleoproteid? 58
IX. Zusammenfassung 64

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545814_0096

I.

Einleitung.

Die Frage nach der chemischen Beschaffenheit der Fermente hat noch in keinem Falle eine endgültige Beantwortung gefunden. Die Schwierigkeiten solcher Untersuchungen ergeben sich vor allem aus dem geringen Vorkommen dieser Stoffe und der Schwierigkeit ihrer Reindarstellung, die besonders durch die leichte Adsorbierbarkeit der Fermente an die beigemengten Verunreinigungen (Eiweißkörper) verursacht ist. Ferner zeigen alle Fermente eine außerordentlich große Empfindlichkeit gegen chemische und physikalische Einflüsse. Mit vorliegender Arbeit soll nun versucht werden, die chemische Natur speziell der Katalase aufzuklären. Die Wahl dieses Fermentes erklärt sich aus seiner überaus großen Verbreitung im Tier- und Pflanzenreiche, die ihm eine wichtige Bedeutung für die Lebensvorgänge verleiht und es außerdem erleichtert, ein passendes Ausgangsmaterial für die Versuche zu finden. Nun ist zwar bei der Katalase durch die Untersuchungen von Waentig und Steche[1]) über die Einwirkung proteolytischer Fermente die Eiweißnatur dieses Ferments sehr

[1]) Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung IV, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 315, 1913.

wahrscheinlich gemacht; es liegt aber noch die Möglichkeit vor, daß diese inaktivierende Wirkung der proteolytischen Fermente auf der Zerstörung eines Eiweißkörpers beruht, der der Katalase als Schutzkolloid dient. Auch die sonstigen Eigenschaften der Katalase zeigen Übereinstimmung mit denjenigen der Eiweißkolloide. Die leichte Hitzedenaturierung, die Nichtdialysierbarkeit, die Empfindlichkeit gegen Säuren, Alkalien und Salze, insbesondere die Aussalzbarkeit, die Alkoholfällbarkeit, ferner die Veränderungen der Katalaselösungen beim Stehen, Verdünnen und Schütteln und das Verhalten bei kinetischen Messungen sind zu erwähnen. Diese Erscheinungen lassen sich jedoch z. T. schon durch die Annahme einer Kolloidnatur der Katalase genügend erklären, vor allem aber ist zu berücksichtigen, daß diese Versuche mit stark verunreinigten Fermentlösungen vorgenommen wurden, und es ist nicht unmöglich, daß die hier der Katalase selbst zugeschriebenen Eigenschaften in Wirklichkeit den verunreinigenden Eiweißkörpern zukommen, die dann den aktiven Körper in Mitleidenschaft ziehen, so daß es, ähnlich wie bei den radioaktiven Körpern, nicht möglich ist, die Eigenschaften des aktiven Körpers und der Verunreinigungen zu unterscheiden. Es soll deshalb die Hauptaufgabe folgender Untersuchung sein, zunächst eine möglichste Reindarstellung der Katalase zu erreichen und ferner die Veränderung ihrer chemischen Eigenschaften mit zunehmendem Reinheitsgrade zu verfolgen.

II.

Löslichkeitsverhältnisse.

Als bestes Ausgangsmaterial erwies sich die Leber von Pferden, deren starker Katalasegehalt zuerst von Batelli und Stern[1]) festgestellt worden ist. Das Material ist leicht in größeren Mengen zu beschaffen und die aktiven Extrakte zeigen sich auch bei langem Aufbewahren und bei Verdünnung mit destilliertem Wasser sehr beständig. Ferner wird die Aktivität durch die ausschließlich verwandten Konservierungsmittel Chloroform und Toluol nicht beeinträchtigt.

Die Bestimmung der Aktivität geschah mit der am meisten verwandten Methode, nämlich durch titrimetrische Messung des durch die Katalase verbrauchten Hydroperoxyds. Obgleich nun die fermentative Hydroperoxydzersetzung nach den ausführlichen Untersuchungen von Waentig und Steche[2]) nicht streng nach den Gesetzen monomolekularer Reaktionen verläuft, sondern infolge der Adsorption des gebildeten Sauerstoffes durch die Katalase einen abweichenden Verlauf nimmt, schließt sie sich doch eng genug an das Schema einer Reaktion

[1]) Soc. Biol. **57**, 375, 1905; vgl. Oppenheimer: Die Fermente, Bd. II, S. 850.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 446, 1912.

erster Ordnung an, daß die Reaktionsgeschwindigkeit angenähert proportional der Katalasekonzentration und unabhängig von der Konzentration des Substrats, d. h. der Hydroperoxydkonzentration, erscheint. Man kann also in erster Annäherung als Maß für die Aktivität der Katalase und mithin für die Menge des vorhandenen Katalysators oder besser für seine Konzentration die nach der Reaktionsgleichung erster Ordnung berechneten sog. K-Werte ansehen.

Die Versuchsanordnung war bei allen Messungen dieselbe.

In einem Meßkolben von 250 ccm Inhalt wurde zu einer $\frac{1}{200}$ n Hydroperoxydlösung, die für jede Versuchsreihe durch Verdünnen von Mercks Perhydrol frisch hergestellt ward, 1 ccm der zweckmäßig (gewöhnlich 1 : 100) verdünnten Fermentlösung zugefügt. Nach dem Umschütteln wurden in Zeitabschnitten von einigen Minuten je 25 ccm des Reaktionsgemisches mit der Pipette entnommen und in mit mehreren Kubikzentimetern verdünnter Schwefelsäure beschickte Erlenmeyer-Kolben entleert, wodurch die Reaktion sofort unterbrochen wurde. Als Zeitpunkt der Entnahme galt der Beginn des Ausfließens der Pipette. Durch Titration mit $\frac{1}{200}$ n Kaliumpermanganatlösung wurde dann in den einzelnen Kolben das noch unzerstörte Hydroperoxyd gemessen.

Die Berechnung der K-Werte geschah nach der Formel

$$0{,}4343\ K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{c_1}{c_2}$$

wobei t_1 und t_2 die Zeitpunkte zweier Entnahmen, c_1 und c_2 die dazu gehörigen Titrationswerte bedeuten.

Zu bemerken ist, daß sämtliche K-Werte mit 10^4 multipliziert sind, um nicht zu kleine Zahlen zu erhalten. Da ferner, wie erwähnt, zur Messung 1 ccm Katalaselösung mit 249 ccm Hydroperoxydlösung vermischt wurde, beziehen sich alle Werte auf die Verdünnung 1 : 250.

Erwähnt sei hier eine bei der Titration alkoholhaltiger Fermentlösungen beobachtete Induktion. Während Kaliumpermanganat allein in der angewandten Verdünnung und in der zur Titration erforderlichen Zeit ohne Wirkung auf Alkohol ist und schon beim ersten Tropfen Rötung hervorruft, oxydiert es in Gegenwart von Hydroperoxyd auch den Alkohol. Dasselbe Verhalten zeigt Glyzerin.

Zur Herstellung von Katalaselösungen wurde bisher am häufigsten die Fällung wässeriger Extrakte aus den katalasehaltigen Geweben mit Alkohol angewandt. Die Fällung kann bei genügend hoher Alkoholkonzentration vollständig gemacht werden, doch ist letztere je nach Art der extrahierten Gewebe verschieden. Bei Blutlösungen genügt das gleiche Volumen Alkohol, bei Leberextrakt muß das doppelte Volumen Alkohol angewandt werden, um eine vollständige Fällung zu erzielen. Aus wässerigen Extrakten der Alkoholfällungen läßt sich die Katalase erneut noch schwieriger mit Alkohol fällen. Es sind dann häufig drei Volumina notwendig, damit die Fällung vollständig wird. Die erzielten Fällungen sind flockig und sehr voluminös und werden erst nach längerem Stehen filtrierbar. Durch die Einwirkung des Alkohols braucht nicht notwendig eine Aktivitätsabnahme der Katalase stattzufinden. Es liegt vielmehr ein anderes Moment vor, das einen Verlust an aktiver Substanz bei dieser Operation bedingt, nämlich das teilweise Unlöslichwerden der Substanz. Es gelingt nicht, aus der vom

ursprünglichen Organextrakt erhaltenen Fällung die Katalase so vollständig wieder auszuziehen, daß der Rückstand völlig inaktiv ist. Offenbar geht neben einer Menge anderer bei dieser Fällung unlöslich werdender Substanzen ein Teil der Katalase selbst in ein irreversibles Gel über: Die lösliche Katalase ist zum Teil in unlösliche übergegangen.

Diesen unlöslichen Anteil kann man erheblich vermehren, wenn man die Alkoholfällung scharf trocknet. Man erhält dann ein sehr aktives Pulver, welches jedoch an die wässerige Extraktionsflüssigkeit nur ganz geringe Mengen Substanz abgibt, auch Extraktion mit Glyzerin führt nicht zum Ziele. Extrahiert man mit etwas verdünnter Natronlauge (ca. $\frac{1}{200}$ n NaOH), so quillt der Rückstand stark auf, und es kann dann dem unlöslichen Anteil noch ein Teil seiner Aktivität entzogen werden (zum Beispiel: Aktivität des wässerigen Extraktes 160, Aktivität des alkalischen Extraktes 6300, Aktivität des wässerigen Extraktes mit nachträglichem Zusatz von Alkali 160); aber eben nur ein Teil, was dafür spricht, daß die Wirkung des Alkalis wohl nur eine mechanische, durch Quellung hervorgerufene ist. Auch durch Extraktion mit verdünnter Kochsalzlösung läßt sich aus dem scheinbar erschöpften Rückstand noch etwas Katalase extrahieren. Allerdings ist die Abgabe von Katalase, verglichen mit der offenbar noch im Rückstand vorhandenen, sehr gering. Das geschilderte Verhalten entspricht dem von Loew an Katalasepräparaten pflanzlicher Herkunft beobachteten, demzufolge er annahm, daß eine lösliche und eine unlösliche Katalase existiere, und daß letztere mit Alkali durch hydrolytische Spaltung in erstere übergeführt werden könne.

Nach dem Gesagten scheint es jedoch nicht nötig, den Lösungsvorgang mit einer hydrolytischen Spaltung der zunächst unlöslichen Katalase verbunden zu denken. Vielmehr genügen die Vorstellungen, die wir von dem Verhalten kolloidaler Körper überhaupt haben, um die beschriebenen Erscheinungen zu erklären. Zur Erzielung möglichst quantitativer Ausbeute ergibt sich jedenfalls die Regel, die Trocknung der Fällung möglichst zu vermeiden.

Zu dieser Schwierigkeit kommt noch, daß, wie schon früher dargelegt wurde,[1]) die Extraktion der Fällung auch bei feinster Verteilung und starker mechanischer Durchschüttelung nur allmählich erfolgt.

Es wurde die Alkoholfällung aus einem Extrakt von 240 g Pferdeleber mit 500 ccm Wasser extrahiert und von Zeit zu Zeit Proben davon abfiltriert, um die Zunahme der Aktivität festzustellen. Nach jeder Entnahme wurde die Mischung stundenlang auf der Schüttelmaschine durchgeschüttelt. Der Erfolg dieser Behandlung erhellt aus den folgenden Tabellen.

Tabelle 1.

Allmähliche Abgabe der Katalase aus einer Alkoholfällung des wässerigen Leberextraktes an die Extraktionsflüssigkeit.

Dauer der Extraktion	K-Werte
2 Tage	122 100
3 „	151 800
7 „	173 300

[1]) Vgl. Waentig und Steche, Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 249 (1911).

Dauer der Extraktion	K-Werte
13 Tage	213 300
31 „	262 100
51 „	284 500

Daß auch nach 51 Tagen die Sättigung noch nicht erreicht wurde, erhellt aus folgendem: Es wurden nun 200 ccm der Extraktionsflüssigkeit abfiltriert und mit frischer Alkoholfällung angesetzt. Die Aktivität stieg nun weiter wie folgt:

Dauer der Extraktion	K-Werte
3 Tage	367 000
28 „	502 500

Ob es möglich gewesen wäre, auf diese Weise noch mehr Katalase in Lösung zu bringen, konnte hier nicht festgestellt werden, da der Versuch abgebrochen werden mußte; später wird von Extrakten die Rede sein, die mehr als noch einmal so aktiv waren. Um einen Begriff von der katalytischen Wirkung eines solchen starken Extraktes zu geben, sei erwähnt, daß beim Zufügen eines Tropfens dieser Fermentlösung zu 20 ccm einer 10 prozentigen Peroxydlösung das Peroxyd momentan unter heftigem Aufschäumen und starker Erwärmung zersetzt wird.

Ferner wurde der abgesaugte Rückstand der obigen Dauerextraktion zur Hälfte mit 100 ccm frischen Wassers angesetzt. Nach siebentägigem Stehen betrug die Aktivität wieder 37480. Es war also auch keine Erschöpfung der Fällung eingetreten. Was die Erklärung dieses Verhaltens anlangt, so ist auch hier kaum zu schließen, daß etwa die Langsamkeit der Extraktion auf einen hydrolytischen Vorgang zurückzuführen wäre, der vorausgehen müßte, um die Auflösung der Katalase zu ermöglichen, sondern

es ist wahrscheinlich anzunehmen, daß die Katalase an den mitgefällten Verunreinigungen adsorbiert [1]) ist und deshalb nur langsam an die Extraktionsflüssigkeit abgegeben wird.

[1]) Über die leichte Adsorbierbarkeit von Fermenten im allgemeinen und speziell an unlösliche Eiweißkörper vgl. Oppenheimer: a. a. O., S. 32 ff. und S. 369 f., sowie S. 47 dieser Arbeit.

III.

Fraktionierte Fällung.

Jedenfalls legte die Langsamkeit der Extraktion der Katalase aus der Alkoholfällung den Gedanken nahe, durch fraktionierte Extraktion eine weitere Reinigung der Extrakte zu erreichen. Zu diesem Zwecke wurden 600 g mittels einer Fleischmaschine fein zerkleinerter Pferdeleber mit 500 ccm Wasser einige Stunden extrahiert. Der Extrakt wurde mit 1 l 96 proz. Alkohol gefällt und der Rückstand nach dem Absaugen und Auswaschen mit immer neuen Portionen destillierten Wassers von je 500 ccm ausgezogen, und zwar in der Weise, daß die Extraktionsdauer immer zunahm. Die Extrakte wurden abfiltriert und ihre Aktivität, Trockensubstanzgehalt und Aschengehalt bestimmt. In der folgenden Tabelle 2 sind die Versuchsergebnisse mitgeteilt.

Wie zu erwarten, nimmt mit jeder weiteren Extraktion Trockensubstanzgehalt, Aschengehalt und Aktivität des Extraktes ab, aber nicht in gleicher Weise: Wie aus Spalte 5 und 6 von Tabelle 2 folgt, in denen der Trockensubstanzgehalt und Aschengehalt für den Aktivitätswert des Anfangsextraktes berechnet ist, sinken relativer Trockensubstanz- und Aschengehalt bis zur fünften Extraktion, und zwar die Trockensubstanz auf

ca. $^1/_3$ ihres Anfangswertes, die Asche auf weniger als die Hälfte. Bei den späteren Extraktionen wachsen diese Relativwerte wieder. Die Extrakte werden also zunächst reiner, dann nehmen sie wieder relativ mehr Verunreinigungen auf als Katalase. Bei der ersten Extraktion werden

Tabelle 2.

Fraktionierte Extraktion einer Alkoholfällung.

Extraktion	Dauer des Schüttelns und der Extraktion	Trockensubst. in 100 ccm	Asche in 100 ccm	Trockensubst. in 100 ccm berechnet auf K = 266 100	Asche in 100 ccm berechnet auf K = 266 100	Aschengehalt in Proz. der Trockensubst.	K-Werte
A I	$^1/_4$h	0,76	0,109	0,76	0,109	14,3	266 100
B I	1h	0,38	0,053	0,57	0,079	13,8	177 900
C I	1h	0,17	0,024	0,52	0,074	14,2	85 600
D I	2h	0,088	0,013	0,43	0,062	14,6	54 875
E I	9h, 5 Tage	0,091	0,008	0,46	0,042	9,2	52 925
F I	21$^1/_2$h, 6 Tage	0,072	0,006	0,62	0,054	8,8	31 025
G I	31h, 7 Tage	0,058	0,003	2,12	0,121	5,7	7 275
H I	3$^1/_2$h, 90 Tage	0,116	0,003	27,56	0,717	2,6	1 120

offenbar relativ sehr viel Verunreinigungen an das Lösungsmittel abgegeben, obgleich, wie der anfängliche sehr hohe Aktivitätswert erkennen läßt, auch die Hauptmenge der Katalase sehr schnell in Lösung geht. Es ist also eine Reinigung der Katalase nur mit sehr großen Verlusten möglich, auch wenn man die Extraktionsdauer der ersten Extraktion noch verringerte, um weniger an Katalase zu verlieren, was übrigens wegen der Langsamkeit der Filtration der Gemische wiederum nicht gut angängig ist. Immerhin sind die Ergebnisse dieser

Versuche interessant, indem sie zeigen, daß, wenn man die sicherlich zu günstige Annahme macht, die mittleren Extrakte, d. h. die, in denen der relative Trockensubstanzgehalt am geringsten ist, enthielten reine Katalase, mindestens $^1/_3$ der Trockensubstanz des ersten Extraktes und über die Hälfte der Asche als Verunreinigung enthalten sind. Ferner ist bemerkenswert, daß der Aschengehalt der Trockensubstanz, solange sie noch erhebliche Mengen Katalase enthält, relativ groß, nämlich über 10 % ist und erst dann sinkt, wenn die Extrakte nur noch wenig aktiv erscheinen.

Wie schon hervorgehoben, zeigen die so gewonnenen Extrakte der Alkoholfällung eine relativ große Beständigkeit ihrer Aktivität, wenn man sie bei tiefer Temperatur (Eisschrank) mit einem indifferenten Konservierungsmittel, Chloroform oder Toluol, stehen läßt. Es tritt hierbei sogar eine sehr willkommene Selbstreinigung der Extrakte ein, indem ein nicht unbeträchtlicher Bodensatz sich abscheidet, der um so erheblicher ist, je unreiner der ursprüngliche Gehalt war, und der sich als völlig inaktiv erweist. Die Verhältnisse seien an einem Beispiele erläutert. Der Extrakt A I besaß anfänglich die Aktivität 266 100 bei einem Trockensubstanzgehalt von 0,76 %. Nach $3^1/_2$ Monaten ist die Aktivität 242 000, nach der Filtration 239 700, also nur um wenige Prozente von dem ursprünglichen Werte verschieden, während der Trockensubstanzgehalt der filtrierten Lösung auf 0,61 % gesunken war.

In einem weiteren Fraktionierungsversuch wurden die Bestimmungen von Aktivität, Trockensubstanz und Aschengehalt ausgeführt, nachdem die Extrakte nach etwa dreimonatigem Stehen abfiltriert worden waren.

Berechnet man den Trockensubstanz- und Aschengehalt ebenfalls, um vergleichbare Werte zu erhalten, auf K = 266 100, so ergeben sich ganz erheblich größere Reinheitsgrade als für die Serie 1, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht. Bemerkenswert ist aber, daß auch hier, wie in den Extrakten der Tabelle 2, der Aschengehalt der Trockensubstanz sehr erheblich ist, nämlich 10 % übersteigt.

Tabelle 3.

Zusammensetzung der wässerigen Extrakte einer Alkoholfällung des wässerigen Leberextraktes nach erfolgter Selbstreinigung.

Extraktion	Dauer des Schüttelns und der Extraktion	in 100 ccm		in 100 ccm berechnet auf K = 266 100		Aschengehalt in Proz. der Trockensubst.	K-Werte
		Trockensubst.	Asche	Trockensubst.	Asche		
A II	10′	0,67	0,086	0,48	0,061	12,8	374 000
B II	2¼ h, 1 Tag	0,205	0,026	0,23	0,029	12,7	238 000
C II	8 h, 2 Tage	0,078	0,012	0,26	0,039	15,1	78 900
D II	5 h, 4 Tage	0,077	0,012	0,38	0,058	14,5	54 375

Es war wichtig, zu entscheiden, ob der hohe Aschengehalt erheblich vermindert werden konnte, ohne die Aktivität der Substanz zu schädigen. Zu diesem Zwecke wurde in möglichst stark aktiven Extrakten eine zweite Fällung vorgenommen. Da man hierbei mit ziemlich großen Flüssigkeitsmengen arbeiten mußte, weil, wie schon erwähnt, zur vollständigen Fällung das dreifache Volum Alkohol erforderlich war, und da außerdem der

entstehende Niederschlag infolge seiner feinen Verteilung sich nur sehr schwierig abfiltrieren ließ, schien es wünschenswert, den Katalaseextrakt vor der Fällung möglichst zu konzentrieren. Zu diesem Zwecke wurde versucht, die Katalaselösung durch Ausfrieren oder durch Verdampfen im Vakuum einzuengen, doch erwiesen sich beide Wege nicht als brauchbar.

Ein Teil eines wässerigen Extraktes wurde 4 Stunden lang im gefrorenen Zustande erhalten. Nach dem Auftauen und langsamen Erwärmen auf Zimmertemperatur zeigte sich zwar ein geringer Rückgang der Aktivität, doch wurde nach einem Tage, wie auch andere Versuche bestätigten, der ursprüngliche K-Wert wieder erreicht. Darauf wurde nach nur teilweisem Gefrieren des Extraktes der noch flüssige Teil abfiltriert und in beiden Teilen die Aktivität bestimmt. Vor dem Ausfrieren betrug die Aktivität 54 400; die Aktivität des nicht gefrorenen Anteils war 54 300, die des gefrorenen Teils 51 700, so daß überhaupt keine Konzentrationsänderung eingetreten war. Günstiger zeigte sich das Einengen im Vakuum: Es gelang zum Beispiel, 32 ccm des Extraktes A I auf den vierten Teil zu konzentrieren. Obgleich hierbei das Eindampfen möglichst langsam bei niedriger Temperatur vorgenommen wurde, mußte doch der Versuch infolge des starken Schäumens der Lösung oft unterbrochen werden. Die Aktivität stieg bis auf 800 000 (vor der Einengung 266 100) und wurde also nur wenig geschwächt. Bei einigen anderen Extrakten konnte die Vakuumeinengung infolge übermäßigen Schäumens und der Abscheidung von Eiweißsubstanz nicht durchgeführt werden.

Um feststellen zu können, ob durch das Umfällen der Katalase eine teilweise Inaktivierung stattfand, wurde

eine zweite Fällung nach dem Auswaschen mit verdünntem Alkohol in der gleichen Menge Wasser gelöst, wie Extrakt zur Herstellung der Fällung verwendet worden war. Nach etwa 30 Tagen Extraktionsdauer wurde abfiltriert und die Aktivität, Trockensubstanz- und Aschengehalt bestimmt.

Tabelle 4.

Beeinflussung der Zusammensetzung der Extrakte durch nochmaliges Umfällen mit Alkohol.

	Trocken-subst.	Asche	Trocken-subst.	Asche	Asche-gehalt in Proz. der Trocken-subst.	K-Werte
	in 100 ccm		in 100 ccm berechnet auf K = 297 300			
Extraktion der I. Fällung	1,064	0,089	1,064	0,089	8,5	297 300
Extraktion der II. Fällung	0,454	0,022	0,500	0,024	4,7	269 600
Filtrat der II. Fällung	0,448	0,064	—	—	—	fast inaktiv

Es ergab sich, wie aus Tabelle 4 hervorgeht, daß Trockensubstanz- und besonders Aschengehalt sehr erheblich abgenommen hatten, ohne daß die Aktivität sehr wesentlich verringert worden wäre. Wie zu erwarten war und durch die Kontrollanalysen des Filtrats der 2. Fällung bestätigt wurde, ist der Verlust an Trockensubstanz zum größten Teil und der Verlust an Asche ausschließlich darauf zurückzuführen, daß sich ein Teil der Wiederfällung durch Alkohol entzogen hatte. Der fehlende Anteil an Trockensubstanz und die sehr geringe Menge an anorganischen glühbeständigen Verbindungen war offenbar

unlöslich geworden und nicht wieder bei der Extraktion in Lösung gegangen. Berechnet man nun hier den Gehalt der Trockensubstanz an Asche, so findet sich gegenüber dem Extrakt der ersten Alkoholfällung eine sehr erhebliche Abnahme, die beweist, daß der hohe Aschengehalt nicht wesentlich für die Wirkung der Katalase ist.

Nach diesem günstigen Ergebnis war nun Hoffnung vorhanden, durch Wiederholung der Alkoholfällung die Reinigung der Extrakte noch weiter zu treiben. Leider erwies sie sich als trügerisch, da bei einer dritten Fällung fast die ganze Trockensubstanz zur Ausfällung kam und auch wieder vollständig in Lösung ging.

Was nun die Schätzung des Reinheitsgrades der Katalase aus dem Verhältnis von Aktivität und Trockensubstanz anlangt, so ist klar, daß diese Schätzung nur eine Berechtigung hat, wenn man annimmt, daß die Wirksamkeit der Extrakte nur von der Konzentration der Katalase abhängt, und zwar dieser proportional ist. Letzteres ist von Senter, Michaelis sowie Waentig und Steche angenähert bestätigt. Erstere Bedingung trifft aber sicherlich nicht zu, was aus den zahlreichen Beobachtungen über Giftwirkung hinreichend erhellt. Man ist im Gegenteil um so weniger berechtigt, aus Gleichheit der Wirkung zweier Extrakte verschiedener Herkunft ohne weiteres auf gleiche Fermentmengen zu schließen, als die größte Wahrscheinlichkeit besteht, daß die Regulierung der Fermentwirkungen im Organismus nicht durch quantitative Unterschiede, sondern durch ebensolche Giftwirkungen verursacht wird. In unserem Falle ist nur deshalb eine solche Schätzung berechtigt, weil Ausgangsmaterial sowie

Vorbehandlung der Extrakte nicht wesentlich verschieden sind, so daß nur die rein quantitativen Unterschiede in den Mengen der vorhandenen Verunreinigungen einen Einfluß besitzen könnten, über deren geringe Wirkung beispielsweise die Ergebnisse der später beschriebenen Dialysierversuche einen gewissen Anhaltspunkt liefern.

Um einen Begriff von der außerordentlich starken Wirkung der Leberkatalase zu geben, sei bemerkt, daß, wenn man die Versuche mit dem B II bezeichneten Extrakt in Betracht zieht, die Konzentration der Katalase im Reaktionsgemisch nur 0,0000082 % betragen muß, um in 12 Minuten die Substratkonzentration, d. h. also die Konzentration des Hydroperoxyds, auf den halben Betrag herabzusetzen. Die Konzentration der Asche ist noch um eine Zehnerpotenz geringer. [1])

[1]) Diese Wirkung übertrifft diejenige der koll. Pt-Lösung um fast das 100fache und scheint — soweit hier ein Vergleich möglich — etwa von derselben Größenordnung der Empfindlichkeit zu sein wie die Peroxydasereaktion nach Bach (vgl. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. **47**, 2124, 1914). Es wird sich später zeigen, daß selbst diese hochwirksamen Lösungen noch zu $^2/_3$ aus Verunreinigungen bestehen.

IV.

Dialyse.

Wie schon früher bewiesen, ist die Katalase selbst nicht diffusibel. Doch enthalten die aktiven Extrakte erhebliche Mengen diffusibler Substanzen, die durch Dialyse entfernt werden können. Solche Dialysierversuche erfordern viel Geduld, denn es gelingt oft nur unvollständig und zuweilen garnicht, die Aktivität der Katalase ungeschwächt zu erhalten.[1]) Von Waentig und Steche[2]) wurde versucht, Gesetzmäßigkeiten in diesem Verhalten aufzufinden. Es läßt sich aber nur sagen, daß die Katalaselösungen eine große Labilität besitzen, die durch Entfernung diffusibler Substanzen so gesteigert wird, daß häufig ein spontanes Inaktivwerden die Folge ist. Diese Labilität zeigt Ähnlichkeit mit dem Verhalten salzhaltiger Globulinlösungen bei der Dialyse, und es war zunächst die Vermutung vorhanden, daß der Salzverlust hier eine ähnliche Rolle spielt, zumal sich die aktive Flüssigkeit bei der Dialyse mehr und mehr trübt. Jedoch ist der sich bildende Bodensatz inaktiv,

[1]) Diese Wirkung der Dialyse ist eine bei Fermenten sehr allgemeine Erscheinung, vgl. hierzu E. Starkenstein, Biochem. Zeitschr. **24**, 210 (1910).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **72**, 259 (1911); **76**, 177 (1912).

und es ließen sich bisher keine bestimmten Beziehungen zwischen Salzverlust, Trübungsgrad und Inaktivierung feststellen. Es ist auch nicht möglich, durch Salzzusatz eine durch Dialyse inaktiv gewordene Fermentlösung völlig zu reaktivieren, es gelingt vielmehr nur eine geringe Steigerung der Aktivität, wenn man die Verdünnung der Katalaselösung mit sehr schwacher Kochsalzlösung vornimmt, sodaß die Kochsalzkonzentration etwa $\frac{1}{200}$ n ist. Dies ist bemerkenswert, weil in nicht dialysierten Lösungen diese Salzkonzentration bereits erheblich schwächend wirkt.[1]) Auch beim Dialysieren gegen eine $\frac{1}{1000}$ n Kochsalzlösung gelang es nicht, die Aktivität konstant zu erhalten.

Zum Teil kann dieses Inaktivwerden dadurch erklärt werden, daß die Katalase von Pergamentpapier oder Kollodiumhäutchen adsorbiert wird. Um dies zu beweisen, wurden die erwähnten Stoffe längere Zeit mit der Katalaselösung in Berührung gebracht. Die Aktivität nahm dann ziemlich stark ab, während das gewaschene Pergamentpapier und Kollodiumhäutchen Wasserstoffsuperoxyd rasch zersetzte.[2]) (Vgl. hierzu die Ergebnisse in der folgenden Tabelle).

[1]) Diese Reaktivierung durch NaCl ist übrigens auch an Diastaselösungen beobachtet worden; bei Leberdiastase ist sie vollständig (vgl. E. Starkenstein, l. c.), bei Ptyalin unvollständig (J. Bang, Biochem. Zeitschr. **32**, 418, 1911).

[2]) Diese Beobachtung ist besonders interessant im Hinblick auf eine ähnliche über die Wirkung von Kollodiummembran auf Oposine und eine Reihe anderer Fermente wie Trypsin, Lab, Pepsin usw. von C. E, Porter (Biochem. Zeitschr. **25**, 301 f., 1910), der allerdings die Wirkung nicht durch Adsorption, sondern durch Antifermentbildung erklärt, weil die mit Kollodium vorbehandelten Fermentlösungen auch eine hemmende Wirkung zeigen.

Tabelle 5.

Wirkung von Kollodiummembran und Pergamentpapier auf Katalaselösung.

Mit Kollodiummembran		Mit Pergamentpapier	
Anfangswert	3518	Anfangswert	3518
Nach 15 h	2377	Nach 4 Tagen	2791
Nach 40 h	2068	Nach 28 Tagen	2530
Nach 19 Tagen	1307		

Um die Dialyse möglichst rasch zu bewerkstelligen, wurde die Lösung in einem Beutel von Pergament, dessen Undurchlässigkeit für Kolloide mit Kongorot geprüft war, dauernd mechanisch durchgerührt. Es wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert und zwar zum Teil gegen fließendes, zum Teil gegen stehendes, um eine Untersuchung der dialysierten Substanz vornehmen zu können.

Die Wirksamkeit der Dialyse wurde durch Bestimmung der Leitfähigkeit der Fermentlösung kontrolliert. Die Tabelle 6 zeigt das Verhältnis zwischen K-Werten und spezifischer Leitfähigkeit im Verlauf einer Dialyse. Als Fermentlösung dienten 200 ccm der 4. Extraktion einer 1. Fällung (DI), das destillierte Außenwasser floß dauernd zu.

Die spezifische Leitfähigkeit, die zu Anfang einer etwa $\frac{1}{1000}$ n Kaliumchloridlösung entspricht, ist schon nach dem zweiten Tage fast auf die Leitfähigkeit gewöhnlichen destillierten Wassers gesunken. Die Abnahme der Aktivität hängt also nicht, wie z. B. bei der Amylase nachgewiesen wurde, mit dem Verlust an Elektrolyten zusammen.

Tabelle 6.

Spezifische Leitfähigkeit während einer Dialyse.

	K-Werte	spez. Leitfähigkeit
Zu Beginn	61 190	$1879 \cdot 10^{-7}$
nach 1 Tage	51 940	$1513 \cdot 10^{-7}$
„ 2 Tagen	42 380	$694 \cdot 10^{-7}$
„ 3 „	25 890	$529 \cdot 10^{-7}$
„ 4 „	18 560	$429 \cdot 10^{-7}$
„ 5 „	12 010	$406 \cdot 10^{-7}$
„ 6 „	9 930	$360 \cdot 10^{-7}$
„ 7 „	6 400	$373 \cdot 10^{-7}$
„ 12 „	5 220	$415 \cdot 10^{-7}$

Weitere Versuche wurden vorgenommen, um den Verlust an Trockensubstanz und Asche festzustellen. Der erste Versuch wurde mit dem Extrakt B I (vgl. Tabelle 2, S. 19) ausgeführt. Nach 24 Stunden Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser wurde eine Probe auf Aktivität geprüft. Es ergab sich eine Abnahme von 177 900 auf 130 000. Die Dialyse wurde unterbrochen und Trockensubstanz und Aschengehalt bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 7 unter b) angegeben. Man sieht, das die Trockensubstanz nur noch 33 Proz. der ursprünglichen beträgt, daß aber der Aschengehalt relativ noch mehr gesunken ist, so daß er, bezogen auf die Trockensubstanz, einen ähnlich niedrigen Wert erreicht wie bei dem Extrakt der doppelten Fällung.

Bei diesem Versuche ist unberücksichtigt, daß beim Dialysieren das Volumen der Innenflüssigkeit nicht kon-

stant bleibt, weil das Volumen vor und nach der Dialyse nicht genau gemessen wurde. Das Volumen nimmt infolge der Ausdehnung des faltigen Pergamentbeutels meist etwas zu, auch wenn man dem Innen- und Außenwasser möglichst gleiches Niveau gibt.

Bei dem folgenden Versuche, bei welchem der Extrakt A I gegen stehendes destilliertes Wasser sieben Tage lang dialysiert wurde, ist diese Veränderung in Rechnung gesetzt. Nach fünftägiger Dialyse wurde das Außenwasser untersucht und erneuert. Die Ergebnisse dieser Dialyse unter Berücksichtigung der Volumveränderung der Innenflüssigkeit und unter Angabe der Zusammensetzung der beiden Außenflüssigkeiten sind in Tabelle 7 unter a) wiedergegeben. Der Erfolg ist ganz entsprechend wie bei Versuch 1. Während die Aktivität nur von 266 100 auf 227 400 sinkt, nimmt die Trockensubstanz um etwa 43 Proz. ab, die in der Hauptsache im ersten Außenwasser zum Vorschein kommt. Der Gehalt an Asche sinkt aber hier sogar auf $^1/_4$ seines ursprünglichen Betrages, sodaß der Aschengehalt der Trockensubstanz von 14,3 Proz. auf nur 5,4 Proz. sinkt.

Bei einem dritten Dialysierversuch wurde schließlich von dem schon sehr aschearmen Extrakt einer zweiten Fällung ausgegangen, dessen Dialyse fünf Tage unter zehnmaliger Erneuerung des Außenwassers fortgesetzt ward. Die Ergebnisse sind im Versuch c) in Tabelle 7 wiedergegeben. Darnach sieht man, daß man den Aschegehalt der Trockensubstanz noch weiter, nämlich bis auf $^1/_2$ Proz. verringern kann, ohne daß die Aktivität erheblich abnimmt.

Zu weiteren Versuchen mit Kollodiumhaut als

Tabelle 7.

Wirkung der Dialyse (Pergamentmembran).

a) auf Extrakt A I.

	Trocken-substanz	Asche	Asche in Proz. der Trocken-substanz	K-Werte
	in 100 ccm.			
Extrakt A I	0,76	0,109	14,3	266 100
Extrakt A I dialysiert	0,47	0,025	5,4	227 400
Außenflüssigkeit	0.32	0,074	—	inaktiv

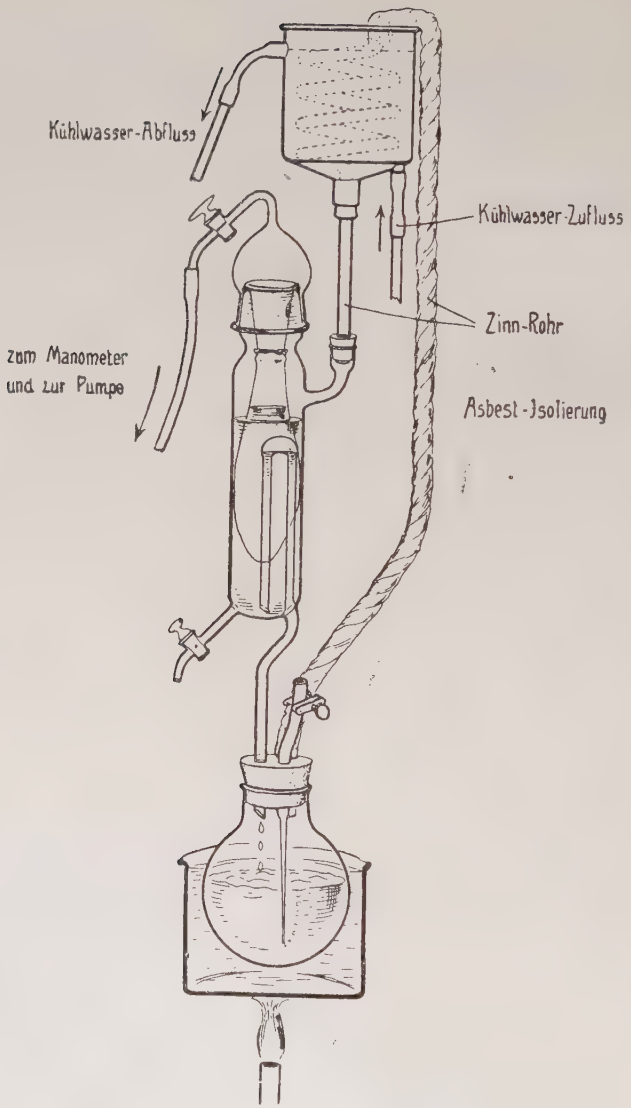
b) auf Extrakt B I.

Extrakt B I	0,38	0,052	13,8	177 900
Extrakt B I dialysiert	0,125	0,014	7,6	130 000

c) auf eine 2. Alkoholfällung.

Extrakt d. 2. Alkoholfällung	1,46	0,040	2,76	1 258 000
Derselbe dialysiert	1,01	0,005	0,53	1 156 000

Membran wurde ein besonderer Dialysierapparat konstruiert, der sich auch für andere quantitative Versuche als praktisch erweisen wird, wenn es nämlich darauf ankommt, mit wenig Außenflüssigkeit eine möglichst vollständige Dialyse zu erzielen und die herausdialysierenden Stoffe im Außenwasser anzureichern. Dieser Dialysierapparat (siehe Figur) besteht aus drei Teilen: dem Kochkolben, dem Kühler und dem Dialysierrohr. Das Außenwasser im Dialysierrohr wird dauernd durch einen Überlauf in den Kochkolben entleert, dort verdampft und nach der Kondensation im Kühler von neuem dem Dialysierrohr zugeführt. Um eine hohe Er-


Kühlwasser-Abfluss
Kühlwasser-Zufluss
Zinn-Rohr
zum Manometer
und zur Pumpe
Asbest-Isolierung

hitzung des Außenwassers zu vermeiden, findet die Destillation unter vermindertem Druck statt.

Als Kochgefäß dient ein mit dreifach durchbohrtem Gummistopfen verschlossener Literkolben aus Jenaer Glas. Durch den Stopfen führen das zum Kühler leitende Rohr, das vom Dialysierrohr kommende Überlaufrohr und ein Kapillarrohr zur Zuführung von Luftbläschen. Die Erhitzung des Kolbens geschieht durch ein Wasserbad. Das Stoßen der Flüssigkeit wird sicher vermieden, wenn der Kolben bis zum Halse in das Wasserbad eintaucht.

Das zum Kühler aufsteigende Rohr, das, wie der Kühler selbst, aus Zinn besteht, ist mit einer Isolierung von Asbest-Schnur geschützt, um eine vorzeitige Kondensation der Wasserdämpfe zu verhindern. Das Kühlrohr ist spiralförmig gewunden und befindet sich in einem oben offenen Blechgefäß mit Zu- und Ablauf für das Kühlwasser. Durch einen Gummistopfen mündet das Kühlrohr in einen seitlichen Ansatz des Dialysierrohres.

Das Dialysierrohr, völlig aus Glas gefertigt, trägt oben eine aufgeschliffene Kappe, von der ein mit Glashahn versehenes, gebogenes Rohr zum Manometer und zur Saugpumpe führt. Ein lose eingelegtes, trichterförmiges Glasrohr trägt den Kollodiumbeutel, eine Öffnung im Glasrohr ermöglicht bei Druckveränderungen einen Ausgleich der in und außer dem Beutel befindlichen Luft. Der Überlauf führt durch den Boden des Dialysierrohres. Sein Knie muß weit genug sein, um eine durch die Kapillarwirkung bedingte vorzeitige Entleerung des Außenwassers zu vermeiden. Schließlich gestattet noch ein Glashahn am Boden des Dialysierrohres, Proben des Außenwassers zur Bestimmung der Leitfähigkeit zu entnehmen.

Der in Betrieb gesetzte Apparat bedarf außer einer gelegentlichen Regulierung der Flamme unter dem Wasserbad keiner besonderen Wartung. Mit einer guten Wasserstrahlpumpe erhält man ein Vakuum von 16—18 mm, hierbei beträgt die Temperatur im Kochkolben etwa 40^0.

Tabelle 8 enthält mit dem beschriebenen Apparat ausgeführte Versuche. Dabei zeigt sich, daß die Summe der Trockensubstanzen von Außen- und Innenflüssigkeit etwas hinter der Menge der Trockensubstanz vor der Dialyse zurückbleibt. Diese Differenz ist auf Rechnung der Adsorption und der Fällungen zu setzen, die bei der Dialyse entstehen (vgl. S. 26). Erstere erklärt auch die hier relativ sehr erhebliche Abnahme der Aktivität. Trotzdem ist der erreichte Reinheitsgrad der Lösungen außerordentlich groß. Rechnet man auf K = 266 100 um, so ergibt sich ein relativer Trockensubstanzgehalt von 0,13 bezw. 0,11 Proz., während in dem Dialysat der doppelten Fällung (vgl. Tabelle 7 c) der relative Trockensubstanzgehalt immer noch 0,23 Proz. beträgt.

Tabelle 8.

Wirkung der Dialyse (Kollodiummembran).

a) Vorbemerkung: Angewandt 125 ccm des Extrakts B II (vgl. Tabelle 3). Nach der Dialyse im Beutel 121 ccm, die Menge der Außenflüssigkeit ca. 800 ccm., Dauer 34 Stunden.

	Aktivität	Trocken-substanz	Asche	Aschen-gehalt in Proz. der Trocken-substanz	Reaktion in der Asche auf	
					Phos-phor-säure	Eisen
Extrakt B II vor der Dialyse	181 500	0,257	0,032	12,7	—	—
Extrakt B II nach d. Dialyse	121 200	0,052	0,0020	4,0	posi-tiv	posi-tiv
Außenflüssig-keit nach der Dialyse	inaktiv	0,150	0,032	—	posi-tiv	posi-tiv

b) Vorbemerkung: Angewandt 100 ccm der Extraktion C II (vgl. Tabelle 3). Nach der Dialyse im Beutel 87 ccm, Menge der Außenflüssigkeit ca. 800 ccm, Dauer 27 Stunden.

Extrakt C II vor der Dialyse	61 500	0,078	0,0118	15,1	posi-tiv	posi-tiv
Extrakt C II nach d. Dialyse	35 300	0,018	0,0010	5,0	deut-lich	posi-tiv
Außenflüssig-keit nach der Dialyse	inaktiv	0,050	0,0109	—	stark posi-tiv	Spur

V.

Aschenanalysen.

Nachdem also gefunden war, daß ein außerordentlich großer Anteil der Mineralstoffe für das Zustandekommen der katalytischen Wirkung belanglos ist, schien es von Interesse, die Zusammensetzung der Asche der Extrakte kennen zu lernen und festzustellen, ob sich bei dem Reinigungsverfahren einzelne Aschenbestandteile anreichern. Qualitative Vorprüfungen hatten dabei ergeben, daß die Extrakte an anorganischen Substanzen in der Hauptsache Phosphorsäure, Eisen und Alkalien, nämlich K und Na enthielten, während Erdalkalien und Magnesium und auch Mangan nicht nachweisbar waren. Die Abwesenheit von Mangan wurde mehrmals in der Asche verschiedener Katalasepräparate mit der sehr empfindlichen Bleisuperoxydprobe in salpetersaurer Lösung nach Entfernung jeglicher Chlorspuren dargetan.[1]) Was ferner Eisen und Phosphor anlangt, auf die natürlich besonders geachtet wurde, so konnte festgestellt werden, daß beide Stoffe selbst in den reinsten Extrakten niemals vollständig fehlten.

[1]) Diese Feststellung ist wichtig mit Rücksicht auf die Tatsache, daß bekanntlich gewisse oxydierende Fermente, z. B. die Laktase Bertrands, manganhaltig sein sollen.

Weiterhin ergab sich, daß bei der Dialyse ein großer Teil der Phosphorsäure herausdialysierte, während die Asche der Außenflüssigkeit von Eisen fast frei war. Dies Verhalten des Eisens konnte schon durch den Augenschein erkannt werden. Die Asche der ungereinigten Extrakte war gelblich, die der dialysierten Extrakte infolge hohen Eisengehaltes braun, während die Asche der Außenflüssigkeit fast weiß war. Daß das Eisen nicht herausdialysiert, erklärt sich daraus, daß es nicht in Ionenform in den Extrakten vorhanden ist. Es läßt sich nämlich durch Rhodankalium und Ammoniumsulfid nicht nachweisen, auch nicht nach dem Einengen im Vakuum. Läßt man aber mit Salz- oder Salpetersäure in der Kälte stehen oder erwärmt man einige Augenblicke mit diesen Säuren, so wird das Eisen abgespalten und ist dann leicht mit den genannten Reagenzien festzustellen. Dies Verhalten erinnert sehr an die von Salkowsky[1]) aus der Leber isolierten Nukleoproteideiweißstoffe, die ebenfalls leicht abspaltbares Eisen zu enthalten scheinen. Es schien also nicht unmöglich, daß der Eisengehalt in den Extrakten von dem Vorhandensein solcher eisenhaltiger Nukleoproteide herrührt.

Es lag auch nahe, zu vermuten, daß der Eisengehalt von noch vorhandenem Hämoglobin herrühren könne, das sich aus dem blutreichen Organ natürlich auch nicht annähernd vollständig mit einfachen Mitteln entfernen ließ. Und tatsächlich konnte auch in den unreineren Extrakten Hämoglobin spektroskopisch durch seine Überführung in das sogenannte Hämochromogen nachgewiesen

[1]) Zeitschr. physiol. Chem. 59, 19 (1909).

werden. Die Schwäche des Spektrums bewies jedoch schon, daß es sich um sehr geringe Mengen von Hämoglobin handelte. In reineren Extrakten, gerade in denen also, in welchen sich das Eisen anreichert, verschwindet jedoch jede Spur von Hämoglobin und seinen Derivaten, so daß es ausgeschlossen ist, daß der Eisengehalt durch Hämoglobin verursacht ist.

Auch der Phosphor verschwindet, wie schon oben angedeutet, bei sorgfältig dialysierten Lösungen nicht gänzlich. Dieser nicht dialysierbare Phosphor ist jedoch ebenso wie das Eisen leicht abspaltbar. Beim Fällen der Katalase mit Salpetersäure in der Kälte [1]) geht er in das Filtrat und läßt sich beim Kochen mit Salpetersäure und Molybdänlösung als Phosphormolybdat ausfällen.

Quantitative Bestimmungen von Eisen und Phosphor in Extrakten verschiedenen Reinheitsgrades bestätigen den qualitativen Befund.

Die Bestimmung des Eisens machte einige Schwierigkeiten, weil immer nur geringe Bruchteile von Prozenten der Trockensubstanz davon vorhanden waren und ja immer nur relativ wenig Substanz zur Verfügung stand. Von einer titrimetrischen Bestimmung mit Kaliumpermanganat wurde daher abgesehen. Die Asche wurde mit Königswasser gelöst, das Chlor durch mehrmaliges Abrauchen mit reiner, eisenfreier HNO_3 entfernt und auf kolorimetrischem Wege mit einer empirisch hergestellten Skala durch die Färbung mit Rhodanammonium die Bestimmung des Eisens in der Lösung nach geeigneter Verdünnung durchgeführt.

Die Bestimmung des Phosphors geschah auf titrime-

[1]) Vgl. S. 44.

trischem Wege nach der Methode von C. Neumann [1]) mit Molybdänlösung nach vorausgegangener Zerstörung der organischen Substanz mit einem Salpeterschwefelsäuregemisch.

Um nicht zu ausführlich zu werden, soll davon abgesehen werden, in jedem Falle die Analysenresultate im einzelnen anzugeben. Es wurden zur Kontrolle stets Parallelbestimmungen ausgeführt. Das Beispiel einer Analyse sei im folgenden gegeben. Im übrigen sind die Ergebnisse der Bestimmungen, die auf gleiche Weise erhalten und, wie gesagt, immer durch Parallelversuche kontrolliert wurden, in der folgenden Tabelle vereinigt.

Tabelle 9.

Eisen- und Phosphorgehalt der Extrakte.

	Trockensubstanz in 100 ccm	Asche in 100 ccm	Aschegehalt in Proz. der Trockensubstanz	Trockensubst. in 100 ccm berechn. für K = 1 258 000	Asche in 100 ccm berechn. für K = 1 258 000	Phosphor in Proz. der Trockensubstanz	Phosphor in Proz. d. Asche	Eisen in Proz. der Trockensubstanz	Eisen in Proz. der Asche	K-Werte
Extrakt der I. Alkoholfällung	1,25	0,102	8,21	3,31	0,272	1,26	15,35	0,05	0,56	475 000
Ektrakt der II. Alkoholfällung	1,46	0,040	2,76	1,46	0,040	0,51	18,48	0,07	2,47	1 258 000
Derselbe dialysiert	1,01	0,0046	0,53	1,10	0.0058	0,12	22,60	0,05	10,0	1 156 000

[1]) Vgl. Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. I, S. 386 ff.; vgl. auch Beckurts: Die Methoden der Massanalyse, 1913, S. 170.

Der Gang der Phosphorbestimmung war also folgender: 1,5747 g Trockensubstanz werden in einem $^3/_4$ l-Kolben mit der nötigen Menge des Säuregemisches verbrannt, die klare, farblose Lösung nach dem Abkühlen mit 140 ccm Wasser verdünnt und mit 50 ccm 50 proz. Ammoniumnitratlösung auf 80° erhitzt und heiß mit 40 ccm 10 proz. Molybdänlösung versetzt. Nach einviertelstündigem Stehen und Abkühlen mit eiskaltem Wasser wird bis zum Verschwinden der sauren Reaktion dekantiert und nach Überführung des aschenfreien Filters in den Kolben der Niederschlag mit überschüssiger $\frac{n}{4}$ Natronlauge gelöst, darauf bis zum Verschwinden der Ammoniakdämpfe gekocht und mit $\frac{n}{4}$ Schwefelsäure zurücktitriert.

1.

zum Lösen zugegeben . . . 30,60 $\frac{1}{4}$ n NaOH

zurücktitriert . . . . . 23,47 $\frac{1}{4}$ n H_2SO_4

verbraucht . . . . . 7,13 $\frac{1}{4}$ n NaOH

entsprechend 1,98 mg P = 0,12 Proz. der Trockensubstanz.

2.

1,8732 g Trockensubstanz

zum Lösen zugegeben . . . 20,40 $\frac{1}{4}$ n NaOH

zurücktitriert . . . . . 12,36 $\frac{1}{4}$ n H_2SO_4

verbraucht . . . . . 8,04 $\frac{1}{4}$ n NaOH

entsprechend 2,23 mg P = 0,12 Proz. der Trockensubstanz.

Aus der in der Tabelle 9 erfolgten Zusammenstellung der quantitativen Befunde läßt sich folgendes entnehmen:

Der in dem ungereinigten Extrakt in ziemlich erheblicher Menge enthaltene Phospor läßt sich bei der Reinigung des Extraktes durch Umfällung und Dialyse (vgl. die in Tabelle 8 Spalte 2 und 3 gegebenen Relativwerte für Trockensubstanz und Aschegehalt) zum größten Teil entfernen (Abnahme auf ca. $^1/_{10}$ des ursprünglichen Gehaltes der Trockensubstanz), ein Restbetrag von etwa 0,1 Proz. der Trockensubstanz wird jedoch auch bei lang ausgedehnter Dialyse hartnäckig zurückgehalten. Daß die übrigen Aschebestandteile, außer dem Eisen, rascher und vollständiger entfernt werden, ergibt sich aus dem wachsendem Gehalt an Phosphor in der Asche, der als P_2O_5 berechnet im Dialysat fast die Hälfte der Asche beträgt.

Diese Anreicherung in der Asche ist beim Eisen noch viel stärker. Berechnet als Fe_2O_3, wären in der Asche des Dialysats etwa 15 Proz. davon enthalten, während die Asche des ungereinigten Extraktes etwa den 20. Teil davon enthielt. Auf die Trockensubstanz berechnet ändert sich der Fe-Gehalt dagegen nicht wesentlich, was besagen würde, daß die bei dem Reinigungsverfahren verschwindenden inaktiven Substanzen ebenso eisenhaltig sein müßten wie der aktive Stoff.

VI.

Ist die Katalase ein Eiweisskörper?

Es fragte sich nun weiter, ob es möglich sei, über die organische Substanz, welche die Aktivität bedingt, Näheres zu ermitteln. Zunächst konnte gezeigt werden, daß die aktive Alkoholfällung der wässerigen Extrakte der Leber an ätherextrahierbaren Substanzen (Fett) so gut wie nichts enthielt, denn eine zweitägige Extraktion einer sorgfältig gepulverten Alkoholfällung im Soxhletapparat ergab einen Extrakt von weniger als 0,2 Proz. Dies erscheint mit Bezug darauf von Wichtigkeit, daß Katalase häufig gerade in den fettreichen Geweben gefunden wird.[1])

Dagegen konnten mit Sicherheit kohlehydratähnliche Verbindungen nachgewiesen werden. Dies ist auch ganz erklärlich, wenn man erwägt, daß gerade die Leber viel Kohlehydrate enthält, und daß der wichtigste Vertreter dieser Gruppe in der Leber, das Glykogen, durch 60 vol.-prozentigen Alkohol vollständig aus seinen Lösungen fällbar ist. Es ist daher unmöglich, durch mehrmaliges Umfällen der Extrakte mit Alkohol die Katalase von Kohlehydrat zu befreien. Es muß aber außer dem

[1]) Vgl. die Untersuchungen von H. Euler, Hofmeisters Beiträge **7**, 1, 1906.

Glykogen auch reduzierender Zucker vorhanden sein, der sich durch Dialyse zum größten Teil entfernen läßt. Denn während die undialysierten Extrakte Fehling-sche Lösung mehr oder weniger stark reduzierten, verschwindet diese Reaktion fast ganz, wenn die Extrakte ausgiebig dialysiert worden waren. Der Rückstand der Außenflüssigkeit zeigte dagegen bei sirupartiger Konsistenz und malzartigem Geruch die Trommersche Probe sehr stark. Dampft man die dialysierten Extrakte ein und hydrolysiert mit 5 proz. Schwefelsäure am Rückflußkühler, so zeigt die Hydrolysenflüssigkeit wieder positive Trommersche Probe, offenbar infolge Glykogengehaltes. der nicht völlig wegdialysiert werden kann.

Koaguliert man durch Erhitzen auf dem Wasserbad die in Lösung befindlichen Eiweißkörper, so zeigt das Filtrat davon vor bezw. nach der Hydrolyse noch reduzierende Eigenschaften, während der Eiweißkörper weder selbst noch seine hydrolytische Spaltprodukte reduzierend wirken.[1]) Hingegen zeigt das Koagulum eine sehr charakteristische mucinartige Beschaffenheit und deutliche Molischsche[2]) Reaktion, wie alle Extrakte auch.

Was nun die Prüfung der Extrakte auf Eiweißstoffe anlangt, so ergab sich folgendes. Sämtliche Extrakte bis zu den reinsten zeigten die typischen Eiweißreaktionen, und zwar sowohl die sogenannten Fällungs- als auch die Farbreaktionen. Von den Fällungsreaktionen seien erwähnt die Fällbarkeit mit den sogenannten

[1]) In käuflichem Pankreatin läßt sich nach Hydrolyse mit 5 %iger Schwefelsäure sehr gut reduzierender Zucker nachweisen.

[2]) Auch Euler, a. a. O., hat die Molischsche Probe in seinen Katalaseextrakten aus tierischen Fetten stets positiv gefunden, was bestätigt werden konnte.

Alkaloidreagenzien bei saurer Reaktion, die Aussalzbarkeit mit Ammonsulfat, die Fällbarkeit durch Alkohol. Beim Erhitzen auf dem Wasserbad tritt Koagulation ein. Das entstandene Koagulum zeigt mucinähnliche Beschaffenheit. Die Koagulation ist erst vollständig, nachdem die Lösung inaktiv geworden ist. Dagegen sei mit Rücksicht auf spätere Betrachtungen hervorgehoben, daß Essigsäure keine Fällung hervorrief, sondern erst Mineralsäuren wie Salz- und besonders Salpetersäure. Bemerkenswert ist, daß alle Extrakte eine sehr starke Fällung mit Bromwasser lieferten. Die bei der Dialyse durch Salzentzug auftretenden Globulinfällungen sind schon an anderer Stelle erwähnt. Da sie aber nicht notwendig mit einer Aktivitätsschwächung Hand in Hand gehen, ebensowenig wie die von eiweißartigen Substanzen herrührenden spontanen Abscheidungen der längere Zeit aufbewahrten Extrakte, so geht daraus hervor, daß diese Eiweißstoffe nicht mit der Katalase identisch sind, daß also die oben genannten Fällungsreaktionen ebenso wie die gleich erwähnten Farbreaktionen von Verunreinigungen herrühren können. Es sei aber hervorgehoben, daß auch die Filtrate von diesen Fällungen, also von inaktiven Eiweißkörpern weitgehend befreite Lösungen, noch sämtliche Eiweißreaktionen zeigen.

Von den zur Prüfung angewendeten Farbreaktionen seien erwähnt die Probe von Adamkiewicz-Hopkins, die bekanntlich auf die Gegenwart des Tryptophankomplexes zurückgeführt wird, die Probe von Millon, die Biuretprobe, Xanthoproteinreaktion und endlich die Schwefelprobe. Letztere trat allerdings bei reineren Extrakten nur ganz schwach auf, so daß es möglich ist, daß die Katalase keinen Cystinschwefel ent-

hält. Die Biuretreaktion wird immer mit blauvioletter Farbe erhalten. Die Probe von Adamkiewicz-Hopkins ist immer außerordentlich intensiv.

Am wichtigsten erschien natürlich für die Erörterung der Frage, ob ein Eiweißkörper vorliege, ein Verfolg des Stickstoffgehaltes der verschiedenen Extrakte.

Bekanntlich hat Euler [1]) schon einmal solche Versuche ausgeführt und war zu dem Resultat gekommen, daß die Fällungen mit wachsendem Reinheitsgrade stickstoffärmer wurden, woraus er schloß, daß die Katalase kein Eiweißkörper sein könne. Er hat aber selbst ausdrücklich betont, daß diese Versuche, die nur sehr kurz angedeutet werden, der Nachprüfung bedürftig seien. Zunächst hatte es den Anschein, als sollten sich die Befunde von Euler für die Leberkatalase bestätigen.

Während nämlich die Alkoholfällung des wässerigen Leberextraktes einen Stickstoffgehalt von ca. 13,3 Proz. zeigte [2]), also nicht weit entfernt war von dem Stickstoffgehalt reiner Eiweißstoffe, zeigte die erste Extraktion dieser Alkoholfällung nur noch einen Gehalt von 6,03 Proz. Stickstoff in der Trockensubstanz. Dieses starke Sinken des Stickstoffgehaltes erklärt sich aber daraus, daß bei der Extraktion offenbar ein großer Teil stickstoffreier Extraktivstoffe in Lösung gehen, während ein Teil der inaktiven stickstoffhaltigen Substanzen (z. B. die Eiweißkörper) durch die Alkoholfällung denaturiert werden und sich so der Wiederauflösung entziehen.

[1]) Vgl. hierüber Waentig u. Steche, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 316, 1913; ferner auch Euler, Anorg. Chemie der Enzyme, Wiesbaden 1910.

[2]) Sämtliche N-Bestimmungen wurden in der Trockensubstanz nach der Kjeldahlschen Methode ausgeführt.

Extrahiert man weiter, so steigt wieder der Stickstoffgehalt und erreicht bei der dritten Extraktion bei annähernd gleichem Reinheitsgrade 10,6 Proz. Weitere Reinigung des ersten Extraktes durch doppelte Fällung und durch Dialyse läßt dann auch den Stickstoffgehalt der ersten Fraktion wieder auf 8—10 Proz. ansteigen. Immerhin wäre nach diesen Befunden anzunehmen, daß entweder auch diese relativ reinsten Extrakte noch sehr stark, etwa zu 50 Proz. verunreinigt wären, oder daß trotz der bisherigen Annahmen die aktive Substanz keine eiweißähnliche Zusammensetzung haben könnte.

Der Beweis für die Richtigkeit ersterer Annahme und die Unrichtigkeit der letzteren konnte nicht durch die bisher angewandten Methoden der Reinigung erbracht werden. Dagegen führte die Anwendung der selektiven Adsorption zum Ziel.

VII.

Adsorptionsversuche.

Bekanntlich werden die Fermente, wie zuerst von Michaelis [1]) festgestellt worden ist, sehr leicht durch Körper mit großer Oberfläche adsorbiert. Gelang es, ein Adsorptionsmittel ausfindig zu machen, das nur das Ferment selbst ohne die vorhandenen Verunreinigungen adsorbierte, so konnte dadurch eine Trennung der Katalase von ihren vermeintlichen Verunreinigungen herbeigeführt werden.

Zunächst zeigte sich, daß die Katalase sehr leicht von allen bekannten Adsorptionsmitteln aufgenommen wird (geprüft wurden Blutkohle, Bolus alba, Talkum und Aluminiumhydroxyd; Magnesia usta eignete sich wegen ihrer schwach alkalischen Reaktion nicht als Adsorbens). Um den Einfluß der Adsorption auf die Aktivität festzustellen, wurden je 5 ccm der Katalaselösung F I (s. Tab. 2) mit 5 ccm Wasser und annähernd gleichen Mengen von Blutkohle, Bolus alba und Aluminiumhydroxyd und

[1]) Zuerst hat L. Michaelis die leichte Adsorbierbarkeit der Fermente festgestellt und diese Eigenschaft zur Bestimmung des elektrischen Ladungssinnes der Fermente herangezogen. Bioch. Zeitschr. **7**, 492, 1908 und **10**, 283, 1908. Vgl. auch Oppenheimer, l. c. S. 369.

ferner zur Kontrolle 5 ccm F I nur mit 5 ccm Wasser versetzt und unter gelegentlichem Umschütteln einen Tag im Eisschrank belassen. Die unfiltrierten, aufgeschüttelten Proben zeigten folgende K-Werte:

Katalase + Wasser:	18 265
Katalase + Blutkohle:	5 843
Katalase + Kaolin:	11 909
Katalase + Aluminiumhydroxyd:	15 401

Die filtrierten Lösungen waren inaktiv, die Adsorption war somit in allen Fällen vollständig. Da bei der Katalasewirkung nach den Versuchen von Waentig und Steche [1]) Diffusionsvorgänge eine Rolle spielen, die von der Größe der Oberfläche der kolloidalen Fermentteilchen abhängen, so erklärt sich der Aktivitätsrückgang der adsorbierten Katalase aus der Verringerung der wirksamen Fermentoberfläche. Von dem Reaktionsverlauf der adsorbierten Katalase gibt Tabelle 10 ein Bild. Um möglichst gleiche Aktivität der gelösten und der adsorbierten Katalase zu erhalten, war die Katalase in ersterem Falle 1 : 10, in letzterem 1 : 11 verdünnt worden. Der Reaktionsverlauf zeigt in beiden Fällen keine wesentlichen Unterschiede und bildet somit einen neuen Beweis für die kolloidale Natur der Katalase. Der größere Aktivitätsrückgang bei der Adsorption mit Bolus alba erklärt sich aus der stärkeren Sedimentierung der Fermentteilchen zwischen den einzelnen Entnahmen.

Durch Verringerung des adsorbierten Stoffes und der Adsorptionsdauer gelang es weiterhin, die aktive Substanz ziemlich vollständig an das Adsorptionsmittel

[1]) Über die fermentative Hydroperoxydzers. III. Zeitschrift f. physiol. Chem. **79**, 446 (1912).

Tabelle 10.

Reaktionsverlauf der adsorbierten Katalase.

	Katalase in Lösung	durch Bolus alba adsorbiert	Katalase in Lösung	durch Aluminiumhydroxyd adsorbiert
	K	K	K	K
2′	2 823	2 850	2 972	3 276
4′	2 530	2 274	2 246	2 805
7′	2 267	2 156	2 632	2 594
11′	2 006	1 949	2 093	2 175
16′	2 323	1 621	2 600	2 402
22′	1 579	1 678	2 213	2 571
29′	1 998	1 410	2 264	2 385
37′				

heranzubringen, ohne daß offenbar eine merkliche Menge der Verunreinigungen mit an das Adsorbens gelangte. Der adsorbierte Stoff konnte dann, ohne daß seine Aktivität darunter litt, mit dem Adsorbens abfiltriert werden, und man konnte so eine mehr oder weniger vollständige Trennung der Lösung von dem Fermente herbeiführen. Am besten eignete sich für diesen Zweck das Aluminiumhydroxyd, da es, wie schon oben erwähnt, die Aktivität der Fermentlösung nur wenig verminderte und sich ferner leicht abfiltrieren ließ, während es vor allem beim Talkum schwer war, klare Filtrate zu erhalten.

Die bisherigen Versuche konnten nun aus Materialmangel leider nicht mit den reinsten Extrakten ausgeführt werden, sondern nur mit einem dritten Extrakt einer Alkoholfällung; also einem Extrakt, der sich auch

durch die bisher angewandten Mittel noch weiter hätte reinigen lassen, und einigen dialysierten Extrakten. Aber sie sind trotzdem geeignet, zu zeigen, was beabsichtigt war, nämlich erstens, daß tatsächlich eine noch außerordentlich viel geringere Substanzmenge, als bisher angenommen, das eigentliche aktive Material bildet, daß also anders ausgedrückt alle, auch die reinsten bisher untersuchten Extrakte noch große Mengen von Verunreinigungen enthielten, und zweitens, daß tatsächlich der Stickstoffgehalt der adsorbierten Substanz, von der man annehmen kann, daß sie hauptsächlich aus Katalase besteht, wesentlich stickstoffreicher ist, als die Trockensubstanzen der untersuchten Extrakte und in ihrem Stickstoffgehalt nahe an denjenigen der echten Eiweißkörper herankommt. Daß es nicht vollständig erreicht wird, ist begreiflich. Denn die Adsorption wird nicht so streng selektiv sein, daß nicht auch geringe Mengen von Verunreinigungen mit adsorbiert würden, die unter der Annahme, daß sie stickstoffärmer wären als Eiweiß, natürlich den Gesamtstickstoffgehalt des Adsorptums herabdrücken müßten. Da die Katalase durch die Adsorption in ihrer Aktivität nur wenig verändert wird, da es ferner möglich ist, durch Abfiltrieren die adsorbierte Katalase vollständig von dem übrigen Extrakt zu trennen und sie dann durch Auswaschen wieder vollständig in Lösung zu bringen, so ist damit ein Weg gegeben, reine Katalaselösungen zu erhalten. Die zuerst adsorbierten Spuren von Verunreinigungen könnte man dann durch Wiederholung derselben Operation entfernen. Die Schwierigkeit liegt nun darin, daß man außerordentlich große Mengen der Extrakte braucht, um eine für genauere Elementaranalysen genügende Fermentmenge zu erhalten.

Das zu den folgenden Versuchen als Adsorbens verwandte Aluminiumhydroxyd wurde durch Fällen von Aluminiumsulfat mit Ammoniak und tagelangem Kochen des Niederschlags mit immer neuen Mengen destillierten Wassers bis zum völligen Verschwinden der alkalischen Reaktion hergestellt. Auch nach dem Verschwinden der alkalischen Reaktion enthält der Niederschlag noch erhebliche Mengen Ammoniak, dessen Menge durch einen blinden Versuch ermittelt und bei der Kjeldahlbestimmung in Abzug gebracht werden muß. Die zu den Versuchen verwandten Aufschlemmungen enthielten ca. 1,25 % bei 100° getrockneten Aluminiumhydroxyds.

Um zunächst einen Anhaltspunkt über die Wirksamkeit dieses Adsorbens einerseits und die Reinheit der Extrakte andrerseits zu bekommen, wurde folgender Versuch angestellt. 300 ccm einer Katalase mit der Aktivität 123 600 und mit dem Trockensubstanzgehalt von 0,23 % wurden mit 25 ccm der Aluminiumhydroxydsuspension versetzt. Nach 5 Minuten war die Aktivität der filtrierten Flüssigkeit auf 1642, nach 30 Minuten auf 750 zurückgegangen. Trockensubstanzbestimmungen ergaben, daß im ersten Fall 67,2, im zweiten 54,6 % nicht adsorbiert waren. Aus diesen Versuchen ließ sich also folgern, daß der hier untersuchte Extrakt zu mindestens $^2/_3$ seiner Trockensubstanz nicht aus Katalase bestand und daß also die Extrakte ihre Wirksamkeit noch einer wesentlich geringeren Substanzmenge verdanken. Untersucht man die adsorbierte Substanz qualitativ, so finden sich in der Asche wieder Phosphorsäure und Eisen, die Trockensubstanz selbst gibt natürlich die Eiweißreaktionen. Die Reaktion auf reduzierenden Zucker ist negativ, auf Schwefel positiv, während das

Filtrat die Eiweißreaktionen nicht mehr zeigt, dagegen noch deutlich vor bezw. nach der Hydrolyse die Anwesenheit reduzierenden Zuckers erkennen läßt. Die Molischsche Probe ist hingegen auch im Adsorptum noch deutlich positiv.

Wiederholt man solche Versuche mit anderen Extrakten unter etwas veränderten Bedingungen hinsichtlich Menge und Dauer der Einwirkung des Adsorptionsmittels, so ergibt sich, abgesehen von einem Fall, in dem bemerkenswert wenig Substanz adsorbiert wurde, daß zur angenäherten Inaktivierung der Extrakte unabhängig von ihrem ursprünglichen Reinheitsgrad immer ungefähr die gleiche Menge Substanz aus den Extrakten entfernt werden muß, wenn die ursprüngliche Aktivität der Extrakte annähernd dieselbe war (vgl. Tabelle 11). In einem anderen Versuche, in dem von einem viel aktiveren Extrakt ausgegangen war, dessen K-Wert 630 000 und dessen Trockensubstanzgehalt 0,412 % betrug, ging nach Einwirkung des Adsorptionsmittels die Aktivität auf 196 700 zurück, während der Trockensubstanzgehalt nur 0,127 % betrug. Zur Entfernung des dreifachen Aktivitätsbetrages bedarf es rund des Verlustes der dreifachen Menge Substanz. Natürlich sind die hier gemachten Rechnungen nur ganz rohe. Sie zeigen aber doch, daß eine angenäherte Proportionalität besteht zwischen adsorbierter Menge und Aktivitätsverlust, woraus gefolgert werden kann, daß die adsorbierte Substanz ziemlich reine Katalase ist.

Die Wirkungskraft der Katalase ist nach diesen Versuchen noch viel beträchtlicher, als nach den früheren Berechnungen anzunehmen war. Nehmen wir an, daß die in den Versuchen in Tabelle 11 adsorbierten Mengen

reine Katalase sind, so ergibt eine Rechnung, daß nur ca. 1 mg reiner Katalase in der Verdünnung 1 : 205 000 genügt, um die Konzentration einer Hydroperoxydlösung in etwa 12 Minuten auf die Hälfte ihres anfänglichen Wertes herabzusetzen.

Tabelle 11.

Wirkung der Adsorption durch gefälltes Aluminiumhydroxyd auf die Zusammensetzung und Aktivität der Extrakte.

		Aktivität	Trockensubst. in 100 ccm	Asche in 100 ccm	Aschegehalt in % der Trockensubstanz
3. Extrakt. ein. Alkohol-Fällg.	Vor der Adsorption	142 458	0,302	0,030	10,0
	Nach der Adsorption	11 644	0,246	0,020	8,12
I. Dialysat	Vor der Adsorption	181 500	0,102	0,0123	12,1
	Nach der Adsorption	4 210	0,030	0,0093	31,0
II. Dialysat	Vor der Adsorption	140 000	0,147	0,0147	10,0
	Nach der Adsorption	fast inakt.	0,112	0,0134	11,7
III. Dialysat	Vor der Adsorption	196 700	0,217	0,0153	7,0
	Nach der Adsorption	fast inakt.	0,148	0,0152	10,4

Die mitgeteilten Ergebnisse gestatten nun auch eine angenäherte Berechnung der in der Leber vorhandenen Menge des aktiven Stoffes. Nach Tabelle 2 würde sich ergeben, daß man durch Extraktion von 600 g Pferdeleber mit 500 ccm Wasser eine Lösung von der Aktivität 676 820 erhalten könnte. Diese Zahl ist einfach gewonnen durch Summierung der Aktivitätswerte der einzelnen Extraktfraktionen. Diese Zahl ist nun sicher zu niedrig, denn es ist dabei nicht berücksichtigt, daß die wässerige Extraktion der zerkleinerten Leber nicht vollständig ist, und ferner, daß durch die Alkoholfällung

ein Teil der Katalase denaturiert, d. h. unlöslich wird. Der auf letzterem Wege eintretende Verlust ist bei richtiger Arbeitsweise nicht sehr beträchtlich, der erstere kann in Rechnung gesetzt werden, wenn man den Leberbrei weiter bis zur angenäherten Erschöpfung mit Wasser extrahiert, den wässerigen Extrakt vollständig mit Alkohol fällt und die Extraktion nun in derselben Weise, wie in Tabelle 2 beschrieben, durchführt. Es ergibt sich, daß dann noch ein weiterer Extrakt von 500 ccm mit der Aktivität 300 000 erhalten wird, sodaß man die angenäherte Aktivität einer Lösung, welche die gesamte Katalase von 600 g Pferdeleber in 500 ccm H_2O enthält, auf 1 000 000 ansetzen kann. Nach Tabelle 11 (wobei der dritte Versuch unberücksichtigt bleiben soll) und dem im Text mitgeteilten Versuch über die adsorbierten Mengen ergibt sich ferner, daß einer etwa 0,07 %igen Lösung „reiner" Katalase mindestens die Aktivität 200 000 zukommt. Hiernach müßten 500 ccm Lösung von der Aktivität 1 000 000 also $0{,}07 \times 5 \times 5 = 1{,}75$ g Katalase enthalten, und das wäre dann auch die in 600 g Pferdeleber enthaltene Menge, d. h. 0,29 %. Dabei ist die Leber sicherlich, abgesehen vielleicht von gewissen Organen einiger niederer Tiere, das bei weitem katalasereichste Organ des Tierkörpers.

Betrachten wir die Wirkung der Adsorption auf den Aschegehalt und die Bestandteile der Asche, so ergibt sich folgendes: Abgesehen von dem ersten Beispiel der Tabelle 11, bei dem es sich um einen relativ unreinen, aschereichen Extrakt handelt, sinkt nach der Adsorption der Aschegehalt im Extrakt gar nicht oder nur unwesentlich; das aktive Adsorptum ist also sehr aschearm. Untersucht man aber die Zusammensetzung der Asche

vor und nach der Adsorption, so ergibt sich durch letztere eine auffallende Verarmung der Trockensubstanz an Phosphor und Eisen, wie die folgende Zusammenstellung lehrt:

	Versuch I.		Versuch II.	
	Phosphorgehalt	Eisengehalt	Phosphorgehalt	Eisengehalt
Vor der Adsorption	0,79	1,0	0,79	1,1
Nach der Adsorption	0,38	0,34	0,54	0,30

Die geringen aufgenommenen Aschemengen bestehen also offenbar ausschließlich aus Phosphorsäure und Eisen.

Nach den obigen Befunden ist es nun ganz erklärlich, daß die Trockensubstanz der aktiven Extrakte einen wesentlich niedrigeren N-Gehalt zeigte, als wie ihn die Eiweißkörper aufweisen, wenn man annimmt, daß günstigenfalls die Hälfte davon keine Katalase ist. Es war aber zu erwarten, daß durch die Adsorption ein Verlust an N-Substanz in den Extrakten und eine Anreicherung des Stickstoffs in dem adsorbierten Anteil eintreten würde. So ergab sich denn auch, daß durch die Adsorption der N-Gehalt der nicht adsorbierten Trockensubstanz von 10,6 % auf 9,70 % sank, während er in einem anderen Falle im Adsorptum auf 13,82 bezw. 14,4 % stieg.

Die Stickstoffbestimmungen geschahen nach Kjeldahl; doch ist zu bemerken, daß sie im Gegensatz zu den anderen mitgeteilten Werten, die außerdem immer durch Parallelbestimmungen kontrolliert wurden, nicht sehr genau sein können, weil die Bestimmung der Menge des Adsorptums nur indirekt erfolgen konnte und weil ferner für den N-Gehalt des mitverbrannten Filters sowie des Aluminiumhydroxyds durch einen blinden Versuch

eine kleine Korrektion an dem gefundenen Werte angebracht werden mußte. Bei Berücksichtigung aller Fehlerquellen, die beim Arbeiten mit so großen Flüssigkeitsmengen unvermeidlich sind, müssen die angegebenen Zahlen als untere Grenzwerte angesehen werden. Da ferner, wie die Färbung des Adsorptums erkennen ließ, offenbar nicht ausschließlich der aktive Eiweißkörper adsorbiert wurde, wird man erst durch wiederholte Anwendung der Adsorptionsmethode eine völlige Reinigung des Ferments und einen Stickstoffgehalt, der dem der Eiweißkörper (ca. 16 %) gleichkommt, erhalten können.

Es gelang auch noch auf einem anderen Wege, nämlich durch Hitzekoagulation, die Katalase, in allerdings inaktivem Zustande, zu isolieren und die Tatsache ihres hohen Stickstoffgehaltes zu bestätigen. Zu diesem Zwecke wurden aus 1 kg Rindsleber mit Hilfe der beschriebenen Reinigungsmethoden ca. 4 l Extrakt hergestellt, der bei einer Aktivität von 300 000 einen Trockensubstanzgehalt von 0,092 % und einen Aschegehalt von 0,003 % hatte. Die Probe von M o l i s c h zeigte dieser offenbar schon sehr reine Extrakt nur schwach, seine Asche enthielt P und Fe. Aus der Hälfte des Extraktes wurde auf die beschriebene Weise ein Adsorptum gewonnen; die in je 1000 ccm vorgenommenen Stickstoffbestimmungen gaben die Werte 15,1 und 15,4 %. Mit dem Reste des Extraktes wurde zunächst durch eine größere Reihe von Versuchen die Beziehung zwischen Hitzekoagulation und Hitzeinaktivierung festgestellt, in dem der bei verschiedenen Temperaturen auftretende Trübungsgrad mit dem dadurch verursachten Aktivitätsverlust in der filtrierten und unfiltrierten Flüssigkeit verglichen wurde. Dabei ergab sich, daß mit beginnender

Trübung bei ca. 48° auch ein erheblicher Aktivitätsrückgang verbunden ist, und zwar von gleicher Stärke in der filtrierten und unfiltrierten Lösung; die einmal koagulierte Katalase ist also auch inaktiv. Bei 68° ist die Inaktivierung vollständig. In dem bei dieser Temperatur entstandenen Eiweißkoagulum wurde darauf Stickstoff- und Aschegehalt bestimmt und ebenso die Trockensubstanz und Asche des hierbei erhaltenen Filtrats, sowie die Zusammensetzung beider Aschenrückstände ermittelt. Es ergaben sich ganz entsprechende Resultate wie bei den Adsorptionsversuchen: der Stickstoffgehalt des Koagulums betrug 15,45 %, sein Aschengehalt war gegenüber dem der Trockensubstanz des ursprünglichen Extraktes vermindert. Die Asche war wiederum stark Fe- und P-haltig, während die Asche des Filtrats so gut wie kein Fe und relativ weniger P enthielt. Die Probe von Molisch zeigte das Koagulum nur noch schwach.

VIII.

Ist die Katalase ein Nukleoproteid?

Gelegentlich der Erörterung der Frage, ob es eine unlösliche Katalase gäbe, war auch die Vermutung von Loew erwähnt worden, daß die Katalase ein Nukleoproteid sei. Loew hat diese Annahme nicht besonders erhärtet; nachdem aber gezeigt worden ist, daß die Katalase ziemlich sicher ein Eiweißkörper ist, empfahl sich die nähere Prüfung der Frage. Eine ganze Reihe von Befunden schließen diese Annahme nicht aus. Zunächst ist bekannt, daß z. B. das Trypsin mit den im Pankreassaft enthaltenen Nukleoproteiden vergesellschaftet ist, und daß es nicht möglich ist, dasselbe von diesen Nukleoproteiden zu trennen, ohne daß die Aktivität verloren geht.[1]) Auch andere Fermente zeigen nach neuesten Untersuchungen den Charakter phosphorhaltiger Proteide. Was die Leberkatalase selbst anlangt, so ist zu bemerken, daß die Leber tatsächlich eine erhebliche Menge von Nukleoproteiden enthält, deren Gewinnung aus der Leber nicht wesentlich von derjenigen der Katalaseextrakte ab-

[1]) Nach L. Michaelis und H. Davidsohn scheint das Trypsin identisch mit dem α-Nukleoproteid der Pankreas Hammarstens. Bioch. Zeitschr. **30**, 481 (1911).

weicht.[1]) Es spricht ferner für die Nukleoproteidnatur der Katalase das Vorhandensein nicht dialysierbaren Phosphors, der ja auch in dem sehr reinen Adsorptum in erheblicher Menge angetroffen wird. Desgleichen könnte die Gegenwart von Eisen als ein Kriterium dafür gedeutet werden, daß ein Lebernukleoproteid vorliegt, denn nach Untersuchungen von Salkowski[2]) und anderen enthalten die Nukleoproteide der Leber erhebliche Mengen leicht abspaltbaren Eisens. Ferner ist zu bemerken, daß die Katalase, ebenso wie die bekannten Nukleoproteide, durch Pepsin vollständig gefällt wird. Eine Katalaselösung, deren Aktivität durch Zusatz von Pepsin nur eine Verminderung von 26 000 auf 18 900 erfuhr, zeigte sich nämlich nach dem Abfiltrieren von der entstandenen Fällung völlig inaktiv. Gegen die Auffassung von der Nukleoproteidnatur der Katalase spricht die Tatsache, daß die Katalaselösungen auch in der durch Vakuumeindampfung konzentrierten Form nicht durch Essigsäure gefällt werden, sondern nur durch Mineralsäuren, was dem Verhalten der Nukleoproteide widerspricht, die bekanntlich infolge ihrer überwiegend sauren Eigenschaften durch Essigsäure vollständig fällbar sind. Für die Möglichkeit, daß ein Nukleoproteid in der Katalase vorläge, spricht aber auch der Umstand, daß die Kohlehydratreaktionen, insbesondere die Molisch sche Probe, immer sehr stark positiv gefunden worden sind,

[1]) Vgl. J. Wohlgemut, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 475 (1903); **42**, 519 (1904).

[2]) Vgl. vor allem E. Salkowski, Über die Bindung des Eisens im Nukleoproteid der Leber. Zeitschr. physiol. Chem. **59**, 19 (1909); ferner V. Shoffiri, Zeitschr. physiol. Chem. **58**, 272 (1909).

wenn auch, wie das beispielsweise bei dem Pankreatin des Handels der Fall ist, aus den reineren Präparaten reduzierender Zucker durch Hydrolyse nicht nachweislich abgespalten wird. Ein Zuckergehalt ist bekanntlich aber ebensowenig wie ein Gehalt an Phosphor ausschließlich den Nukleoproteiden eigen, sondern es gibt auch zusammengesetzte Eiweißkörper, welche den einen oder anderen Stoff enthalten (Glykoproteide und Phosphorproteide). Die eigentlichen Nukleoproteide sind Eiweißkörper, welche neben dem eiweißartigen Bestandteil die sogenannte Nukleinsäure enthalten, eine eiweißfreie Säure, die Phosphorsäure und Zucker gleichzeitig neben einer Anzahl stickstoffhaltiger Basen, nämlich Guanin und Adenin, Cytosin und Thymin enthalten. Diese Säure wird durch Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure so leicht gespalten und zerlegt, daß die Stickstoffbasen in der Hydrolysenflüssigkeit mit ammoniakalischer Silberlösung nach dem Neutralisieren mit Barytwasser ausgefällt werden können. Zersetzt man dann die Silbersalze durch Salzsäure, so erhält man beim vorsichtigen Eindampfen der salzsauren Lösung und eventuellen Entfärben mit etwas Tierkohle die salzsauren Verbindungen der Basen. Von diesen sind die sogenannten Alloxurbasen, das Guanin und Adenin, ferner deren Desamidierungsprodukte, die sich bei der Hydrolyse teilweise bilden, das Xanthin und Hypoxanthin, ziemlich leicht nachzuweisen. Für Xanthin und Guanin haben wir in der sogenannten Xanthinprobe ein sehr empfindliches Reagens, für Xanthin außerdem die sogenannte Weidelsche Probe. Für Hypoxanthin und Adenin läßt sich die von E. Fischer angegebene Azulminsäureprobe gut verwenden. Außerdem sind die Kristalle,

speziell des salzsauren Guanins, sehr charakteristisch, ebenso wie die des Guaninpikrates.[1])

Es gelingt demnach auch leicht durch mehrstündige Hydrolyse von 2 g tierischer Nukleinsäure (Merck) mit 25 %iger Schwefelsäure und Neutralisieren mit Barytwasser in dem Filtrat einen reichlichen flockigen Niederschlag mit ammoniakalischer Silberlösung zu erhalten, der nach Zersetzung mit verdünnter Salzsäure und nach Eindampfen auf dem Wasserbade die oben genannten Reaktionen in sehr schöner Weise liefert. Sehr gut gelingt auch die Hydrolyse der Nukleinsäure mit kalter starker Salpetersäure,[2]) wobei sich ein großer Teil der Purinbasen als schwer löslicher Niederschlag der Nitrate in charakteristischen Kristallformen abscheidet und sich so in relativ reiner Form von der Hydrolysenflüssigkeit abtrennen läßt. Auf diesem Wege konnte man auch mit 1 g Nukleinsäure sehr leicht ihre basischen Spaltprodukte nachweisen. Leider ist dieser Weg bei der Hydrolyse der Nukleoproteide ohne vorherige Isolierung der Nukleinsäure nicht gangbar.

Es wurde nun zur Lösung der Frage, ob die Katalase wirklich die Zusammensetzung eines Nukleoproteids habe, versucht, wenigstens das Guanin in den Katalasepräparaten nachzuweisen. Dazu wurden die auf dem Wasserbade eingedampften Extrakte mit 3 %iger

[1]) Vgl. hierzu W. Behrens, A. Kossel und Schiefferdecker: Das Mikroskop und die Methoden der mikroskopischen Untersuchung. Braunschweig 1889. Über den Nachweis von Nukleoproteiden und ihren Spaltprodukten, vgl. Abderhalden. Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden, Band II. Fr. Samuely, S. 449 ff. und H. Steudel, S. 570 ff., ferner Spaeth, Analyse des Harns.

[2]) Abderhalden, a. a. O., Bd. II, S. 584 f.

Schwefelsäure am Rückflußkühler der Hydrolyse unterworfen, die Hydrolysenflüssigkeit mit Barytwasser genau neutralisiert, abfiltriert, der Niederschlag sorgfältigst ausgewaschen und dann in dem mit dem Waschwasser vereinigten Filtrate die Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung vorgenommen. Die Hydrolyse wurde stets mehrere Stunden fortgesetzt, eine Dauer über 7 Stunden verbesserte aber die Ausbeute an Silberniederschlag nicht mehr.

Wie Tabelle 12 zeigt, ergab sich, daß sowohl die Alkoholfällung des wässerigen Extraktes der Leber selbst als auch der Trockenrückstand des wässerigen Extraktes dieser Alkoholfällung, wenn auch in sehr geringem Maße, Silberniederschläge lieferten, die nach Zersetzung mit Salzsäure und Eindampfen der so erhaltenen Filtrate Rückstände ergaben, die zweifellos Guanin enthielten. Jede Silberfällung in der Hydrolysenflüssigkeit verschwand aber vollständig bei weiterer Reinigung der Extrakte, obgleich annähernd dieselbe Menge Trockensubstanz zur Hydrolyse verwandt worden war.

Nach diesen Befunden ist man berechtigt, einen Schluß auf die Natur der Katalase zu ziehen, denn wenn auch nach den Adsorptionsversuchen anzunehmen ist, daß immer noch die Hälfte der Trockensubstanz der Extrakte selbst in den doppelten Fällungen aus Verunreinigungen bestand, daß also statt der angewandten 4 g nur etwa 2 g Katalase zur Hydrolyse kamen, so hätte doch in der Hydrolysenflüssigkeit wenigstens ein merklicher Niederschlag von den Silbersalzen der Alloxurbasen entstehen müssen, wenn diese 2 g aus einem Nukleoproteid bestanden hätten. Die Frage nach der Nukleoproteidnatur der Katalase muß also verneint werden. Die geringen Mengen von Purinbasen, die sich in der

Tabelle 12.

Nachweis von Purinbasen in den Extrakten.

Material	Silber-niederschlag	Reaktionen auf Purinbasen
2 g Nukleinsäure (Merck) . . .	Reichlich	Sämtl. Reaktionen deutlich positiv.
20 g Alkoholfällung d. wässerigen Leberextraktes	Gering	Proben auf Xanthin und Guanin positiv.
8 g Alkoholfällung d. wässerigen Leberextraktes	Gering	Proben auf Xanthin und Guanin positiv.
5 g Trockenrückstand der I. Extraktion der Alkoholfällung .	Sehr gering	Proben auf Xanthin und Guanin schwach positiv.
2 g Trockenrückstand der I. Extraktion der Alkoholfällung .	Kein Niederschlag	—
6 g Trockenrückstand der II. u. III. Extraktion d. Alkoholfällg.	Sehr gering	Proben auf Xanthin und Guanin schwach positiv.
4 g Trockenrückstand des Extraktes der II. Alkoholfällung . .	Kein Niederschlag	—

Alkoholfällung des wässerigen Extraktes der Leber und im wässerigen Auszug dieser Alkoholfällung befinden, verdanken ihren Ursprung mitgefällten und wieder gelösten inaktiven Nukleoproteiden der Leber, oder sie sind als solche in dem wässerigen Leberextrakt vorhanden und werden bei der Alkoholfällung mit niedergerissen.[1])

Andere Körper eiweißartiger Natur, welche die genannten drei Stoffe: Phosphor, Eisen und Zucker, enthalten, sind bisher wohl nur von Hammarsten[2]) in der Schneckenleber gefunden und beschrieben worden, aber es ist fraglich, ob es sich dort nicht um ein Nukleoproteid gehandelt hat.

[1]) Vgl. hierzu J. Smorodinzew, Über die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Leber. Zeitschrift f. physiol. Chem. **80**, 218 (1912).

[2]) Vgl. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, III. Aufl., 1911, S. 292 f u. S. 380.

IX.

Zusammenfassung.

Aus den Alkoholfällungen wässeriger Extrakte der Leber, ebenso wie aus dem Organbrei direkt, läßt sich die Katalase nur schwierig vollständig extrahieren. Der Grund dafür liegt in der Adsorptionswirkung beigemengter unlöslicher Verunreinigungen, sowie in der Denaturierung der Katalase selbst, die durch das Trocknen derselben vergrößert wird. Die Annahme zweier ineinander verwandelbarer chemisch verschiedener Katalasen ist hier nicht am Platze, ebensowenig wie bei der Langsamkeit der Extraktion Sättigungsvorgänge eine Rolle spielen.

Bei der Extraktion der Alkoholfällungen aus den wässerigen Organextrakten gehen noch sehr große Mengen von Verunreinigungen mit in Lösung.

Zur Reinigung der Extrakte kann herangezogen werden:

1. Die fraktionierte Extraktion, wobei die mittleren Fraktionen die reinsten sind.

2. Die Selbstreinigung durch langes Stehen der Extrakte, wobei ein beträchtlicher Teil katalasefreier Substanz (Eiweiß) ausfällt.

3. Die Wiederholung der Alkoholfäl-

lung, deren Wirkung hauptsächlich darin besteht, daß ein großer Teil wässeriger Extraktivstoffe sich der Wiederfällung durch Alkohol entzieht.

4. Die Dialyse, wobei allerdings häufig mit Aktivitätsverlust zu rechnen ist. Die Reinigung besteht hier einmal in der Entfernung der dialysierbaren Substanzen, ferner in der durch Salzverlust eintretenden spontanen Abscheidung von inaktiven Eiweißkörpern.

5. Die Adsorption an fein verteilte Substanzen, wie Aluminiumhydroxyd, Kohle, Talkum, Bolus alba (Kaolin).

Die mit Hilfe dieser Methoden angestellten Versuche ergeben über die chemischen Eigenschaften der Katalase folgendes:

Die Katalase ist ein im Vergleich zu seiner Wirksamkeit in außerordentlich geringer Menge (ca. 0,3 %) in der Leber vorhandener wasserlöslicher koagulierbarer Eiweißkörper, der durch Mineralsäuren, besonders Salpetersäure, in der Kälte, aber nicht durch Essigsäure gefällt wird. Der Hitzekoagulation geht eine Inaktivierung voraus, das Koagulum zeigt mucinartige Beschaffenheit. Die Fällungen durch Alkohol und Ammoniumsulfat, für welche die Grenzkonzentrationen von den beigemengten Verunreinigungen abhängen, sind aktive reversible Gele, die nur langsam denaturieren. Fällungsmittel sind ferner die sogenannten Alkaloidreagenzien und Bromwasser in essigsaurer Lösung. Die bekannten Eiweißreaktionen sind sämtlich positiv. Die Biuretprobe wird mit blauvioletter Farbe erhalten.

Der Stickstoffgehalt der Trockensubstanz der Extrakte steigt mit wachsendem Reinheitsgrad auf

15 %, doch handelt es sich bei diesen Analysen wahrscheinlich noch nicht um den völlig reinen Körper.

Der Eiweißkörper enthält vielleicht eine Zuckerart, die sich leicht durch die intensive Molischsche Probe, nicht aber nach der Hydrolyse durch die Fehlingsche Probe erkennen läßt.

Der Gehalt an Mineralstoffen kann außerordentlich verringert werden, ohne daß die Aktivität der Katalase darunter leidet, doch hinterbleibt stets ein Rest von Eisen und Phosphorsäure, der bei der Dialyse nicht verschwindet und bei der Adsorption mit der aktiven Substanz aufgenommen wird. Bei beiden Bestandteilen, vor allem aber beim Eisen, ist es fraglich, ob es sich um integrierende Bestandteile der Katalase handelt.

Purinbasen, welche in der Hydrolysenflüssigkeit der Trockenrückstände unreiner Extrakte sich nachweisen lassen, verschwinden völlig in den reineren. Die Katalase ist also kein Nukleoproteid.

Lebenslauf.

Ich, Walter Gierisch, ev.-luth. Konfession, wurde am 13. Februar 1890 in Kamenz in Sachsen als Sohn des Steinbruchbesitzers Bruno Gierisch, geboren. Nach dem Besuche der Kamenzer Bürgerschule kam ich im Jahre 1901 auf das Wettiner Gymnasium zu Dresden, das ich im Jahre 1909 mit dem Reifezeugnis verließ. Auf den Universitäten Genf und Leipzig hörte ich zwei Semester lang juristische Vorlesungen und wandte mich darauf auf den Universitäten Freiburg i. Br. und Leipzig dem Studium der Chemie zu. Im Februar 1913 legte ich das Verbandsexamen ab und begann auf letztgenannter Universität meine Doktorarbeit. Nach Vollendung der praktischen Arbeit bestand ich am 3. August 1914 in Leipzig die mündliche Prüfung für die Erlangung des Philosophischen Doktorgrades, um dann als Kriegsfreiwilliger in das 1. K. S. Ulanen-Regiment Nr. 17 einzutreten.